RealStar®
Influenza S&T RT-PCR Kit 2.0

11/2012

RealStar®

Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 2.0

Pour utilisation avec

m2000rt (Abbott Diagnostics)

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT™ kPCR Molecular System AD (Siemens)

ABI Prism® 7500 SDS and 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Rotor-Gene™ 3000/6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

CFX96™/Dx Real-Time System (BIORAD)



 Usage de diagnostic *in vitro*

 Référence: 162013

 96 tests

 Conserver à -25°C ... -15°C

 Novembre 2012

 altona Diagnostics GmbH • Mörkenstraße 12 • D-22767 Hamburg

MAN-162010-FR-01

Content

RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 2.0

1. Usage prévu

Le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR 2.0 est un test de diagnostic in vitro qualitatif, basé sur la technologie RT-PCR en temps réel, pour la détection des souches saisonnières de grippe A et B, ainsi que pour la pandémie actuelle de H1N1nv. De plus, il permet la différenciation entre les grippes humaines saisonnières A et B et la souche H1N1nv responsable de la pandémie actuelle.

2. Composants du kit

Couleur du couvercle	Bleu	Violet	Vert	Rouge	Orange	Blanc
Composants	Master-mix A	Master-mix B	Contrôle interne	Type Contrôle positif $H1N1_{nv}$	Screen Contrôle positif Influenza A/B	Eau de qualité PCR
Nombre de flacons	8	8	1	1	1	1
Volume [µl/Vial]	60	120	1000	250	250	500

3. Conservation

- Le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR 2.0 est expédié sous carboglace. Les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés au moment de la réception, ou si l'un des tubes a été abimé lors de la livraison, contacter altona Diagnostics GmbH pour demander conseil.
- Tous les composants doivent être conservés à -20°C dès la livraison.
- Des cycles répétés de décongélation et de congélation des réactifs (plus de deux) doivent être évités car ils peuvent affecter les performances du dosage.

Les réactifs doivent être séparés en aliquotes et congelés, si elles doits être utilisés de façon intermittente.

- La conservation a +4°C ne doit pas excéder une durée de 2 heures.
- Protéger les Mastermix A et B de la lumière.

4. Matériels requis non fournis

- Instrument adapté à la PCR en temps réel (Chapitre 6: Description du produit)
- Système ou kit approprié à l'extraction des acides nucléiques
- Centrifugeuse de bureau avec rotor adapté à des tubes de 2 ml
- Centrifugeuse avec rotor pour plaques de microdosage, si vous utilisez des plaques de 96 puits de réaction
- Vortex
- Plaques de 96 puits de réaction ou tubes de réaction avec le matériel correspondant pour leur fermeture (optique)
- Pipettes (règlables)
- Cones de pipettes avec filtres (jetables)
- Gants non talqués (jetables)

NOTE



Merci de vous assurer que les instruments ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus selon les instructions et les recommandations du fabricant.

5. Informations générales

L'Influenza communément appelée la grippe est une maladie infectieuse causée par un virus à ARN de la famille des Orthomyxoviridae (virus de la grippe). Les virus de la grippe sont caractérisés par le continuel changement de leur agent principal de surface, les antigènes hemaglutinines (H) et les neuraminidases (N) (dérive antigénique). Ils infectent les oiseaux ainsi que les mammifères par les aérosols. Les virus de la grippe humaine de type A et B causent de sérieuses infections surtout dans les voies respiratoires, avec de la fièvre, de la toux comme symptômes prédominants. Dans certains cas plus sérieux, la grippe peut causer des pneumonies qui peuvent être fatales, en particulier chez les enfants et les personnes agées. En Avril 2009, une nouvelle souche de grippe évolua, combinant des gènes de souches de grippe de l'homme, du cochon et des oiseaux. Cette souche a émergé au Mexique, aux Etats Unis et dans d'autres pays du monde entier. Elle fut dans un premier temps nommée la grippe porcine. Aujourd'hui ces souches sont nommées H1N1nv.

Les kits d'amorces/sondes utilisées dans le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR 2.0 pour la détection des souches de grippe A et B sont basées sur le gène de la protéine de matrice de la souche cible.

Les kits d'amorces/sondes utilisées pour la détection de la souche de la grippe H1N1nv sont basés sur un alignement multiple de souches connues de la grippe porcine combinées à des séquences connues d'isolats de la „nouvelle" H1N1 pandémique.

Le dosage a été conçu pour résister à des mutations nouvelles ou à venir. Néanmoins, dans le cas ou la souche en circulation évoluerait et accumulerait des mutations, un kit mis à jour pourrait être requis. Afin d'être capable de réagir vite aux mutations à venir, nous comptons fortement sur l'accès aux informations les plus récentes. Cela inclut que l'utilisateur du dosage reporte tous les résultats inhabituels directement à notre service de support technique.

e-mail: **support@altona-diagnostics.com**
téléphone: **+49-(0)40-5480676-0**

NOTE



Etant donné l'évolution moléculaire des virus de la grippe, il y a un risque inhérent pour tous les systèmes basés sur la PCR en temps réel en cas d'accumulation de mutations au cours du temps qui pourraient conduire à de faux négatifs.

6. Description du produit

Le Kit Realstar® Influenza S&T RT-PCR 2.0 est un test de diagnostic in vitro qualitatif, basé sur la technologie RT-PCR en temps réel, pour la détection des souches saisonnières de grippe A et B, ainsi que pour la pandémie actuelle de H1N1nv. De plus, il permet la différenciation entre les grippes humaines saisonnières A et B et la souche H1N1nv responsable de la pandémie actuelle. Le dosage inclue un système d'amplification hétérologue (Contrôle Interne) qui permet d'identifier une éventuelle inhibition de la RT-PCR et de confirmer l'intégrité des réactifs du kit.

Le test est basé sur une technologie RT-PCR en temps réel, utilisant la transcriptase inverse (RT) pour convertir l'ARN en ADN complémentaire (ADNc), la réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification de séquences de cibles spécifiques et les sondes cibles spécifiques pour la détection de l'ADN amplifié. Les sondes sont marquées avec un marqueur fluorescent et un quencher dyes.

Les sondes spécifiques aux souches saisonnières de la grippe humaine A et B sont marquées avec un fluorophore qui montrent les mêmes caractéristiques que le Cy5, tandis que les sondes spécifiques aux à la pandémie actuelle du H1N1nv sont marquées avec le fluorophore FAM. La sonde spécifiques au Contrôle Interne (CI) est marquée avec le fluorophore JOE.

L'utilisation de sondes liées à des fluorophores différents permet la détection en parallèle de l'ADN des souches saisonnières de grippe A et B de l'actuelle pandé-

mie du H1N1nv et du contrôle interne dans les canaux de détecteur correspondant de l'instrument PCR en temps réel.

Le test consiste de trois procédures réalisées dans un même tube à essai:

- transcription inverse de l'ARN cible pour générer des ADNc
- amplification par PCR du Contrôle interne et de la cible d'ADNc
- La détection simultanée des amplicons par un colorant fluorescent des sondes marquées

Le Kit Realstar® Influenza S&T RT-PCR 2.0 a été développé et validé pour être utilisé avec les instruments de PCR en temps réel suivants:

- m2000rt (Abbott Diagnostics)
- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT™ kPCR Molecular System AD (Siemens)
- ABI Prism® 7500 SDS and 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene™ 3000/6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene Q 5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™/Dx Real-Time System (BIORAD)

Le kit RealStar® Influenza S&T RT- PCR 2.0 est composé de:

- Deux réactifs: (Mastermix A et Mastermix B)
- Le modèle de Contrôle interne (CI)
- Deux contrôles positifs: Contrôle positif de dépistage (Grippe A/B)
Contrôle positif de typing (H1N1nv)
- Eau de qualité PCR

RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 2.0

Les réactifs du Mastermix A et du Mastermix B contiennent tous les composants (tampon, enzymes, amorces, sondes) afin de réaliser la transcription inverse, la PCR par amplification et la détection de la cible (grippe humaine A, grippe humaine B, H1N1nv, Contrôle interne) dans une seule mise en place de réaction.

Les amorces et les sondes spécifiques utilisées pour les grippes humaines A et B et pour H1N1nv dans le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR 2.0 ont été conçues par le Prof. Dr. Christian Drosten, Institute of Virology, University of Bonn, Germany. Les séquences de ces amorces et sondes sont listées dans le tableau suivant:

Table 1: Amorces et sondes utilisées pour l'amplification spécifique et la détection des souches des grippes humaines A et B et de H1N1nv

Cible	Sequence 5'- 3'	Oligo
Matrice	AGAGACTTGAAGATGTATTTGCTGGGAAGAT	Sonde 1
Matrice	TCCTGCAAAGACACTTTCCAGT	Sonde 2
Matrice	CAGGCCCCCTCAAAGC	Amorce 1
Matrice	CGTCAGGCCTCCTCAAAGC	Amorce 2
Matrice	ATTCCATGAGAGCCTCAAGATC	Amorce 3

Les amorces et les sondent recherchent les mêmes régions à l'intérieur de la matrice du gène des souches des grippes A et B et H1N1nv. Cependant, le marquage différent des sondes permet de les mettre en compétition les unes avec les autres. En cas de présence d'ARN spécifique à la grippe A, la sonde marquée avec le Cy5 se liera alors que si c'est la souche spécfique au H1N1nv qui est présente c'est la sonde marquée pour le FAM qui se liera.

Par conséquent, et malgré le fait que la souche H1N1nv appartienne à la famille des virus de la grippe A, un échantillon positif au H1N1nv sera présent uniquement dans le canal de détection FAM et pas dans celui du Cy5. Dans le cas d'un échantillon positif à la grippe A, il n'y aura un signal que dans le canal Cy5 mais pas dans le FAM.

7. Mises en garde et précautions

- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé pour les techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Les échantillons doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux et/ou dangereux, en accord avec les procédure de sécurité en vigueur dans le laboratoire.
- Porter des gants jetables non talqués, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons.
- Eviter les contaminations microbiennes et nucléaires (par ADN/ARN) de l'échantillon et des composants du kit.
- Toujours utiliser avec les aérosols des cônes de pipettes jetables non contaminés par l'ADNase et l'ARNase.
- Toujours porter des gants de protection non talqués lors de la manipulation des composants des kits.
- Utiliser des aires de travail séparées les unes des autres pour (i) la préparation des échantillons, (ii) la préparation de la réaction et (iii) l'amplification et la détection de l'activité. Le flux de travail dans le laboratoire doit être unidirectionnel. Porter des gants dans chaque aire de travail et les changer avant d'entrer dans une aire différente.
- Consacrer les fournitures et le matériel aux différentes aires de travail et ne pas les déplacer d'une aire à une autre.
- Conserver le matériel positif oubien potentielle positif séparé des autres composants du kit.
- Ne pas ouvrir les tubes/plaques de réaction après l'amplification afin d'éviter les contaminations avec les amplicons.
- Des contrôles additionnels doivent être faits en accord avec les lignes directrices, aux exigences locales ou gouvernementales ou des organismes d'accréditation.
- Ne pas utiliser des composants au delà de leur date d'expiration.
- Eliminer les échantillons et les déchets d'essai selon la réglementation de sécurités locales.

8. Mode d'emploi

8.1 Pré-traitement des échantillons

Si l'échantillon ne doit pas être utilisé pour une culture virale, des tests d'antigènes et/ou de pathologies, l'écouvillon doit être rincé pendant au moins 10 minutes dans un tampon de lyse contenant au moins 4M d'un agent chaotropique comme l'hydrochloride de Guanidinium ou hydrochloride ou du thyocianate de Guanidinium. L'efficacité et la sensibilité de cette méthode est significativement plus haute par rapport aux méthodes qui nécessitent le rinçage de l'écouvillon avec des agents non dénaturants comme le NaCl ou le PBS. De plus, l'échantillon n'est plus infectieux après l'incubation de l'écouvillon dans le tampon de lyse. (Bow et al.: Virus Inactivation by Nucleic Acid Extraction Reagents. In: Journal of Virological Methods, 119/2004, 195–198).

Il est bien connu que le genre d'écouvillon utilisé pour prélever l'échantillon a un impact important sur les résultats de diagnostic. Les écouvillons en alginate de calcium ou ceux avec du bois ou des parties en aluminium et/ou les coton-tiges sont de potentiels inhibiteurs. Ils peuvent porter atteinte à la PCR et dans certains cas plus graves conduire à des faux négatifs. Par conséquent, nous recommandons fortement l'utilisation d'écouvillons en plastiques et les embouts en matières synthétiques comme le Rayon ou le Dacron. L'utilisation d'écouvillons bactériologique contenant un gel d'agarose (noir ou transparent) n'est pas adapté.

8.2 Extraction de l'ARN

L'ARN extrait est le matériel de départ pour le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR 2.0. La qualité de l'ARN extrait a un impact important sur la performance de l'intégralité du test. Il est important de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de RT-PCR en temps réel.

Les systèmes d'extraction nucléiques et les kits suivants sont recommandés:

- KingFisher® Flex (Thermo Scientific) avec ExtraStar Purification® (altona Diagnostics)
- VERSANT™ Molecular System SP (Siemens)
- HighPure® Viral Nucleic Acid Kit (Roche)
- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

Si pour la préparation des échantillons vous utilisez une colonne comportant des tampons de lavage avec de l'éthanol, une étape de centrifugation supplémentaire de 10 minutes à environ 17000 x g (~ 13000 rpm), en utilisant un nouveau tube à essai, est recommandé avant l'élution des acides nucléiques.
Pour une grande sensibilité, l'ARN doit être élué en 30 µl de tampon d'élution préchauffé (environ 70° C).

NOTE

⚠ ***L'utilisation d'ARN porteur est crucial pour l'efficacité de l'extraction et la stabilité de l'acide nucléique extrait.***



L'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel. Si votre système de préparation de l'échantillon utilise des tampons de lavage contenant de l'éthanol, assurez vous d'éliminer toutes les traces d'éthanol avant de procéder à l'élution de l'acide nucléique.

Pour de plus amples informations ou un support technique concernant le pré-traitement et la préparation des échantillons, merci de contacter notre support technique:

e-mail: **support@altona-diagnostics.com**
téléphone: **+49-(0)40-5480676-0**

8.3 Préparation du Mastermix

Tous les réactifs doivent être complètement décongelés, homogénéisés (à la pipette ou vortexés doucement) et brièvement centrifugés avant leur utilisation.

Le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR 2.0 contient un Contrôle interne hétérologue (CI), peut être utilisé aussi bien comme un contrôle d'inhibition de la RT-PCR ou comme un contrôle lors de la préparation de l'échantillon (extraction de l'acide nucléique) et aussi comme un contrôle de l'inhibition de la RT-PCR.

- Si le contrôle interne est utilisé comme un contrôle d'inhibition de la RT-PCR, mais pas comme un contrôle lors de la procédure de préparation de l'échantillon, alors le Mastermix doit être préparé comme décrit par le schéma de pipetage ci dessous:

Nombre de réactions	1	12
Mastermix A	5 µl	60 µl
Mastermix B	10 µl	120 µl
Contrôle interne	1 µl	12 µl
Volume Mastermix	**16 µl**	**192 µl**

- Si le contrôle interne est utilisé comme un contrôle lors de la procédure de préparation de l'échantillon, et comme un contrôle d'inhibition de la RT-PCR, le contrôle interne doit être ajouté au moment de la procéd*ure d'extraction de l'acide nucléique.

- Peu importe la méthode ou le système utilisé pour l'extraction de l'acide nucléique, le contrôle interne **ne doit pas** être ajouté directement à l'échantillon. Le CI doit toujours être ajouté au mélange échantillon/tampon de lyse. Le volume de CI à ajouter dépend toujours et uniquement du volume d'élution. Il représente 10 % du volume d'élution. Par exemple si l'acide nu-

cléique va être élué dans 60 µl de tampon d'élution ou de tampon, 6 µl de CI par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/tampon de lyse.

NOTE

 ***Ne jamais ajouter le Contrôle Interne directement avec l'échantillon!***

- Si le CI a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, le Mastermix doit être préparé selon le schéma de pipetage suivant:

Nombre de réactions	1	12
Mastermix A	5 µl	60 µl
Mastermix B	10 µl	120 µl
Volume Mastermix	**15 µl**	**180 µl**

8.4 Préparation de la réaction

- Pipeter 15 µl de Mastermix dans chacun des puits nécessaires de la plaque 96 puit ou d'un tube à essai permettant les réactions optiques.
- Ajouter 10 µl de l'échantillon (élué à partir de l'extraction d'acide nucléique) ou 5 µl des contrôles (contrôle positif ou négatif).
- Assurez vous qu'il y a au moins un contrôle positif et un négatif par essai.
- Homogénéiser avec soin les échantillons et les contrôles avec le Mastermix en pipetant.
- Couvrir la plaque de 96 puits avec un film adhésif opaque approprié et les tubes à essai avec un couvercle approprié.
- Centrifuger les plaque de 96 puits avec un rotor à microplaque pendant 30 secondes à environ 1000 x g (~ 3000 rpm).

Préparation de la réaction	
Mastermix	15 µl
Echantillon ou contrôle	10 µl
Volume totale	**25 µl**

9. Programmation des instruments de PCR en temps réel

Pour des informations basiques concernant l'installation et la programmation des différents instruments de PCR en temps réel, merci de vous référer au manuel d'utilisation des différents instruments. Pour des instructions de programmation détaillées concernant l'utilisation du kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR 2.0 sur un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de contacter notre support technique.

9.1 Paramètres

- Définir les paramètres suivants:

Paramètres	
Volume de réaction	25 µl
Taux de rampe	par défaut
Référence passive	aucune

9.2 Traçeurs de fluorescents (fluorophores)

- Définir les traçeurs fluorescents (fluorophores):

Détection	Nom de traçeur	Reporteur	Quencher
l`ARN spécifique Influenza A/B	Inf A/ Inf B	Cy5	(rien)
l`ARN spécifique H1N1nv	grippe porcine	FAM	(rien)
Contrôle interne (CI)	CI	JOE	(rien)

RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 2.0

9.3 Profil de température et aquisition des fluorophores

- Définir le profil de température et l'aquisition des fluorophores:

	Etape	Nombre cycles	Aquisition	Temperature	Durée
Transcription inverse	Tenu	1	-	50 °C	10:00 min
Dénaturation	Tenu	1	-	95 °C	2:00 min
Amplification	Cyclique	45	-	95 °C	0:15 min
			√	55 °C	0:45 min
			-	72 °C	0:15 min

10. Analyse des données

Pour des informations basiques concernant l'analyse des données sur des instrument spécifique de PCR en temps réel, merci de se référer au manuel concerné. Pour des informations détaillées concernant l'analyse des données avec le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR 2.0 sur différents instruments de PCR en temps réel, merci de contacter notre support technique.

10.1 Validité des tests de diagnostic

10.1.1 Validité des tests de diagnostic (qualitatif)

Pour un test de diagnostic **valide** (**qualitatif**), les valeurs suivantes des contrôles doivent être respectés:

Nom du Contrôle	Canal de détection FAM	Canal de détection Cy5	Canal de détection JOE
Contrôle positif de dépistage de la grippe A/B	NEGATIF	POSITIF	POSITIF
Contrôle positif de typing H1N1nv	POSITIF	NEGATIF	POSITIF
Contrôle négatif	NEGATIF	NEGATIF	POSITIF

10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif)

Un test de diagnostic **qualitatif** est **invalide**, (i) si l'essai n'a pas été réalisé complètement ou (ii) si l'une des conditions de contrôle pour l'un des tests de validité du test de diagnostic n'est pas respecté.

En cas de test de diagnostic **invalide**, répéter le test en utilisant les acides nucléiques purifiés restants ou recommencer avec l'échantillon de départ.

RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 2.0

10.2 Interprétation des résultats

N° de l'échantillon	Canal de détection FAM	Canal de détection Cy5	Canal de détection JOE	Interprétation résultats
A	POSITIF	NEGATIF	POSITIF*	ARN spécifique de $H1N1_{nv}$ détecté. [1]
B	NEGATIF	POSITIF	POSITIF*	ARN spécifique du spécifque du grippe saisonnière A et/ou B détecté.
C	NEGATIF	NEGATIF	POSITIF	Pas d'ARN spécifique de la grippe A ou B ou du $H1N1_{nv}$ détecté. L'échantillon ne contient pas de quantité détectable de ces ARN spécifiques.
D	NEGATIF	NEGATIF	NEGATIF	Inhibition de la RT-PCR ou échec de le réactifs. Répéter le test à partir de l'échantillon original ou bien prélever et tester un nouvel échantillon.

* La détection du contrôle interne dans le canal de détection JOE n'est pas requise pour les résultats positifs dans le canal de détection FAM ou dans le canal de détection Cy5. De hautes charges en virus de la grippe dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux du contrôle interne réduits ou absents. Ceci n'a aucune influence sur le résultat du test.

[1] La souche $H1N1_{nv}$ apparatient à la famille des virus de la grippe A. Néanmoins, à cause de la conception du dosage, les échantillons positifs $H1N1_{nv}$ génèrent un signal positif dans le canal du FAM mais pas dans le Cy5.

Pour de plus amples détails concernant l'interprétation des résultats, merci de contacter notre support technique.

NOTE

 ***En dépit du fait que la souche H1N1nv appartienne au groupe du virus de la grippe A, dû à la conception des essais, les échantillons positifs au H1N1nv donneront un signa positif dans le canal FAM mais pas dans le Cy5.***

 ***Les échantillons positifs à la grippe saisonnière A donneront un résultat positif dans le canal Cy5 mais pas dans le canal FAM.***

RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 2.0

11. Evaluation des performances

11.1 Sensibilité analytique

Pour évaluer la sensibilité analytique, des dilutions en série ont été effectuées sur des plaques positives quantifiées à la grippe A/H1N1, A/H3N2 et A/H1N1nv.

Table 2: Taux de succès des analyses pour les différentes souches

PFU / ml	Influenza A / H1N1nv	Influenza A / H3N2	Influenza A / H1N1	Influenza B*
10^4	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10^3	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10^2	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10^1	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+
10^0	+/-/-/-	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/-
10^{-1}	-/-/-/-	+/+/-/-	+/-/-/-	-/-/-/-
10^{-2}	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
10^{-3}	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-

*Focus-forming units (FFU) au lieu de plaque-forming units (PFU)

11.1.1 Analyse Probit

- Influenza A/HK/1/68 (H3N2):
  Limite de détection à 95 % (LoD) 0.3 PFU/ml [95 % CI 0.2 - 0.7 PFU/ml]
- Influenza A/HH/09 (H1N1nv):
  Limite de détection à 95 % (LoD) 0.7 PFU/ml [95 % CI 0.5 - 1.8 PFU/ml]
- Influenza A/Texas/91 (H1N1):
  Limite de détection à 95 % (LoD) 1.6 PFU [95 % CI 1.1 - 3.8 PFU/ml]
- Influenza B/Brisbane/60/2008:
  Limite de détection à 95 % (LoD) 1.1 FFU [95 % CI 0.5 - 1.8 FFU/ml]

11.2 Spécificité analytique

11.2.1 Souches de grippe

Table 3: Souches de la grippe analysées avec le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR 2.0

Souche	Soustype	Inf A/B	$H1N1_{nv}$	IC
Influenza A/Anhui/07/290	H5N1	+	-	+
Influenza A/Anhui/1/105	H5N1	+	-	+
Influenza A/Bangkog/1/79	H3N2	+	-	+
Influenza A/Bangkog/80/517	H3N2	+	-	+
Influenza A/Brazil/11/78	H1N1	+	-	+
Influenza A/Brazil/83/550	H1N1	+	-	+
Influenza A/Brisbane/08/100	H1N1	+	-	+
Influenza A/Brisbane/10/2007	H1N1	+	-	+
Influenza A/Brisbane/59/2007	H1N1	+	-	+
Influenza A/England/427/88	H3N3	+	-	+
Influenza A/England/88/654	H3N3	+	-	+
Influenza A/Equine/Kentucky/1/81	H3N8	+	-	+
Influenza A/Equine/Kentucky/85/520	H3N8	+	-	+
Influenza A/Equine/Miami/63	H3N8	+	-	+
Influenza A/Equine/Miami/87/510	H3N8	+	-	+
Influenza A/Equine/Newmarket/1/93	H3N8	+	-	+
Influenza A/Equine/Newmarket/97/596	H3N8	+	-	+
Influenza A/Guizhou/54/89	H3N2	+	-	+
Influenza A/Guizhou/90/502	H3N2	+	-	+
Influenza A/Johannesburg/33/94	H1N1	+	-	+
Influenza A/Johannesburg/95/516	H1N1	+	-	+
Influenza A/Philipines/2/82	H3N2	+	-	+
Influenza A/Philipines/94/516	H3N2	+	-	+

RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 2.0

Table 3: (suite)

Souche	Soustype	Inf A/B	$H1N1_{nv}$	IC
Influenza A/Shangdong/78/516	H3N2	+	-	+
Influenza A/Shangdong/9/93	H3N2	+	-	+
Influenza A/Turkey/07/112	H5N1	+	-	+
Influenza A/Turkey/1/2005	H5N1	+	-	+
Influenza A/Uruguay/08/278	H3N3	+	-	+
Influenza A/Uruguay/716/2007	H3N3	+	-	+
Influenza A/Vietnam/05/204	H5N1	+	-	+
Influenza A/Vietnam/119/04	H5N1	+	-	+
Influenza B/Ann Arbor/1/86		+	-	+
Influenza B/Ann Arbor/86/630		+	-	+
Influenza B/Florida/08/140		+	-	+
Influenza B/Florida/8/2006		+	-	+
Influenza B/Harbin/7/94		+	-	+
Influenza B/Harbin/97/748		+	-	+
Influenza B/Hong Kong/79/568		+	-	+
Influenza B/Hong Kong/79/568		+	-	+
Influenza B/Malaysia/08/184		+	-	+
Influenza B/Malaysia/2506/2004		+	-	+
Influenza B/Norway/1/84		+	-	+
Influenza B/Norway/84/542		+	-	+
Influenza B/Brisbane/60/2008		+	-	+
Influenza A/Brisbane/10/2007	H3N2	+	-	+
Influenza A/Brisbane/59/2007	H3N2	+	-	+
Influenza A/Chicken/Germany R3294/2007	H5N1	+	-	+
Influenza A/Hamburg/2009	$H1N1_{nv}$	-	+	+
Influenza A/Bayern/63/2009	$H1N1_{nv}$	-	+	+
Influenza A/California 2009	$H1N1_{nv}$	-	+	+

11.2.2 Réactivité croisée

La spécificité analytique du kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR a été évaluée en testant un testant un panel d'ARN/ l'ADN génomique extrait de différents pathogènes respiratoires principalement.

Table 4: Organismes testés afin de démontrer la spécificité analytique du kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR 2.0

Organismes	Influenza H1N1nv	Influenza A/B	Contrôle interne
Virus respiratoires Syncytial (RSV A et RSV B)	-	-	+
Virus paragrippaux (Types 1 à 4)	-	-	+
Metapneumovirus humain	-	-	+
Rhinovirus (Type 1a)	-	-	+
Enteroviruses	-	-	+
Coronavirus humains (OC48, 229E, NL63)	-	-	+
Adenoviruses (Types 1 et 7)	-	-	+
Bordetella pertussis	-	-	+
Chlamydia pneumonia	-	-	+
Herpesvirus (HSV-1, HSV-2, CMV, EBV, VZV)	-	-	+

Le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR n'a présenté aucune réaction croisée avec les organismes ci dessus.

RealStar® Influenza S&T RT-PCR Kit 2.0

11.2.2 Substances interférentes

Table 5: Résultats des échantillons contenant différentes substances interférentes possible

Substances interférentes possible	Resultat 30 pfu/ml (H1N1nv souche HH)	Resultat 3 pfu/ml (H1N1nv souche HH)
Mucine (10 %, bovine)	+	+
Sang (EDTA sang)	+	+
l´ADN génomique humain (2 µg / PCR)	+	+
Écouvillons (5 fabricants)	+	+
Milieu de transport viral (3 fabricants)	+	+
Écouvillons bactériologique (contenant de l'agar)	-	-

11.3. Sensibilité clinique

Aucune étude prospective pour la détermination de la sensibilité clinique n'a encore été effectuée car il n'existe aucun dosage approuvé pour comparer. En remplacement, un échantillon est déclaré comme grippe positif si au moins un des échantillons positifs en technique RT-PCR „en maison" est également disponible avec une preuve additionnelle de sa positivité (séquençage, test des antigènes ou culture virale). Ces échantillons sont nommés „échantillons pré-testés positifs" et „pré-testés négatifs" respectivement. Ces échantillons ont été testés à nouveau avec le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR.

Table 6: Resultats du diagnostic d'évaluation

	Positifs H1N1nv par RealStar® Influenza S&T RT-PCR	Négatifs H1N1nv par RealStar® Influenza S&T RT-PCR
pré-testés positifs	141	5
pré-testés négatifs	4	89

12. Limites et précautions

- L'utilisation de ces produits est limitée au personnel compétent et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Le respect des Bonnes Pratiques de Laboratoire est essentiel pour assurer la performance du dosage. Une attention particulière doit être donnée à la préparation des échantillons afin de préserver la pureté des composants du kit. Tous les réactifs doivent être minutieusement suivis afin d'éviter les impuretés et les contaminations. Le moindre réactif douteux doit être écarté.
- Il est nécessaire de respecter les procédures de prélèvement de l'échantillon, de transport et de conservation afin d'assurer les performances optimales du test.
- Ce dosage n'est pas destiné à être réalisé directement sur l'échantillon. L'extraction des acides nucléiques doit avoir été réalisée au préalable.
- La présence des inhibiteurs de RT-PCR peut être une cause de faux négatifs ou de résultats erronés.
- De potentielles mutations dans les régions du génome de la grippe couvertes par les amorces et/ou les sondes peuvent conduire à de mauvais résultats pour la détection du virus.
- Comme avec tous les tests de diagnostic, les résultats du kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR 2.0 doivent être interprétés en prenant en considération tous les symptômes cliniques.

13. Contrôle de qualité

D`apres le système de management de la qualité d'altona Diagnostics GmbH selon ISO EN 13485, chaque lot du kit RealStar® Influenza S&T RT- PCR 2.0 est testé selon les spécifications prédéfinies afin d'assurer la qualité constante du produit.

14. Assistance technique

Pour le support client, merci de contacter notre support technique:

e-mail: **support@altona-diagnostics.com**
téléphone: **+49-(0)40-5480676-0**

15. Marques déposées et responsabilité

RealStar®, ExtraStar® (altona Diagnostics GmbH); Mx 3005P™ (Stratagene); ABI Prism® (Applied Biosystems); HighPure®, LightCycler® (Roche); Rotor-Gene™, QIAamp® (QIAGEN); VERSANT™ (Siemens); KingFisher® (Thermo Scientific).

Les noms déposés, les marques déposées, etc. utilisées dans ce document, même si ils ne sont pas spécifiées comme tels ne doivent pas être considérées comme non protégées par la loi.

Le kit RealStar® Influenza S&T RT-PCR 2.0 est un test de diagnostic *in vitro,* marqué CE, en accord avec la Directive européenne 98/79/EC.

N'est pas disponible dans tous les pays.

16. Explications des symboles

IVD Dispositif medical de diagnostic *in vitro*

REF Référence produit

LOT Numéro de lot

Contient le nombre suffisant pour réaliser „n“ tests (rxns)

Limites de température

Version

Utiliser avan

Attention

Se reporter au manuel d‘utilisation

Fabricant

NOTES